

การใช้แคลเซียมแลคเตทในการชะลอเกิดสีน้ำตาลและการเสื่อมสภาพ ของผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภค

Calcium Lactate Application for Delay Browning and Deterioration of Fresh-Cut Romaine Lettuce

พฤติยา นิลประพุกษ์* จูติพร อุสสาหะ และ ชวินันท์ แก้วแกน

Phrutiya Nilprapruck*, Thitiporn Usaha and Tawinan Kaokaen

Received: 15 October 2020, Revised: 28 October 2021, Accepted: 20 December 2021

บทคัดย่อ

การเกิดสีน้ำตาลในผักกาดแปรรูปพร้อมบริโภคเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพและการยอมรับของผู้บริโภค งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการใช้แคลเซียมแลคเตทที่ระดับความเข้มข้น 1.5% ในการชะลอการเกิดสีน้ำตาลและการเสื่อมสภาพของผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภค จากการทดลองพบว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตท เป็นเวลา 10 นาที มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลเมื่อเทียบกับผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่ไม่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตท (ชุดควบคุม) ค่าคะแนนการเกิดสีน้ำตาล (Browning index) ที่ต่ำมีความสัมพันธ์กับการลดลงของการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล และกิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonialyase (PAL), Polyphenol oxidase (PPO) และ Peroxidase (POD) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้การเสื่อมสภาพของเซลล์เมมเบรน พิจารณาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Lipoxxygenase (LOX), ปริมาณ Hydrogen peroxide (H_2O_2) และ Malondialdehyde (MDA) มีการเพิ่มสูงขึ้น จากการทดลองพบว่า การใช้สารละลายแคลเซียมแลคเตทสามารถลดการสะสมของปริมาณ MDA, Hydrogen peroxide และกิจกรรมของเอนไซม์ LOX ดังนั้นการใช้แคลเซียมแลคเตทสามารถชะลอการเกิดสีน้ำตาลและเสื่อมสภาพของผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคได้

คำสำคัญ: ผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภค, แคลเซียมแลคเตท, ปฏิกริยาการเกิดสีน้ำตาล, การเสื่อมสภาพ

ABSTRACT

Browning symptom in fresh-cut romaine lettuce is an important problem, affecting quality and consumer acceptance. This research is to study the effects of 1.5% calcium lactate delay browning and deterioration of fresh-cut romaine lettuce. These results showed that the fresh-cut romaine lettuce immersed in calcium lactate for 10 minutes had inhibited browning efficiency compared to non-treated calcium lactate (Control). Lower browning index was directly associated with a decrease in phenolic compounds, enzyme activities of Phenylalanine ammonialyase (PAL), Polyphenol oxidase (PPO) and Peroxidase (POD) in contrast with the control. Additionally, deterioration of membrane cells can investigate the increase of enzyme activity of Lipoxigenase (LOX), content of Hydrogen peroxide (H_2O_2) and Malondialdehyde (MDA). This research showed that the use of calcium lactate solution can reduce the accumulation of MDA content, hydrogen peroxide and enzyme activity of LOX. Hence, the use of calcium lactate in fresh-cut romaine lettuce can delay browning and deterioration.

Key words: fresh-cut romaine lettuce, calcium Lactate, browning reaction, deterioration

บทนำ

ผักกาดหวานเป็นผลิตภัณฑ์ประเภทหนึ่งที่คนนิยมปลูกและบริโภคกันมากขึ้น เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารสูง ส่วนใหญ่ถูกนำมาแปรรูปเป็นผักสลัดพร้อมบริโภค แต่ปัญหาสำคัญที่พบ คือ มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเซลล์ของผักกาดหวานถูกทำลายจากกระบวนการแปรรูป ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านชีวเคมีต่างๆ เช่น การสลายตัวของคลอโรฟิลล์ การสูญเสีย น้ำ การสูญเสียวิตามินซี และกระบวนการเกิดสีน้ำตาล (He and Luo, 2007) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลต่อคุณภาพของผักกาดหวานและการยอมรับของผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดสีน้ำตาลเนื่องจากเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคสามารถมองเห็นได้ โดยทั่วไปผักกาดที่ผ่านการตัดแต่งจะเกิดสีน้ำตาลบริเวณบาดแผล และมีอัตราการหายใจที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษาสั้น การเกิดสีน้ำตาลในผักและผลไม้มีสาเหตุมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก

โดยมีเอนไซม์ Polyphenol oxidase (PPO) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำให้สารประกอบฟีนอลิกเปลี่ยนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำตาล (Moon *et al.*, 2020) นอกจากนี้ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์มีการเปลี่ยนแปลงและเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นตลอดเวลา การเสื่อมสภาพสามารถวัดได้จากการกระบวนการเกิด Lipid peroxidation โดยการเกิด Lipid peroxidation ในสิ่งมีชีวิตเกิดจากสภาวะความเครียด ส่งผลให้เกิดความเสียหายทางชีวโมเลกุลเรียกว่า Oxidative damage ซึ่งปกติพืชมีการปรับสมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ หากเกิดการสะสมของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์มากเกินไปส่งผลให้เกิดการเสื่อมสภาพและการตายของเซลล์ในที่สุด (Baysal and Demirdoven, 2007)

ปัจจุบันมีวิธีการเก็บรักษาและยับยั้งการเกิดสีน้ำตาลและการเสื่อมสภาพของผักแปรรูปพร้อมบริโภค ได้แก่ การใช้วิตามินซี (Ascorbic acid), การลดอุณหภูมิ (Pre-cooling) และการดัดแปลงสภาพบรรยากาศ (Modified atmosphere) เป็นวิธีการปรับปรุง

คุณภาพของผักกาดแปรรูปพร้อมบริโภคให้มีลักษณะคุณภาพใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์เดิมและสามารถเก็บรักษาได้ยาวนานมากขึ้น มีความพยายามในการศึกษาหาชนิดของสารเคมีที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค มีประสิทธิภาพในการควบคุมคุณภาพและอายุการเก็บรักษา ดังนั้นแคลเซียมแลคเตทซึ่งเป็นสารเคมีที่อนุญาตให้ใช้ได้กับอาหารและมีความปลอดภัย จึงมีการนำมาศึกษาเพื่อชะลอการเกิดสีน้ำตาลและการเสื่อมสภาพ

เกลือแคลเซียม (Calcium salt, Ca^{2+}) ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส (Texture properties) ของผักและผลไม้ ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเนื้อเยื่อ โดยไฮดรอกไซด์ของแคลเซียมเข้าไปเชื่อมโมเลกุลของ Pectin ที่กลุ่ม Carboxyl ที่ว่างอยู่ และลดอัตราการสลายตัวของเซลล์ การใช้แคลเซียมแลคเตทในผักและผลไม้ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงและรักษาคุณภาพทางด้านเนื้อสัมผัส โดยไปมีผลในการยับยั้งการอ่อนนุ่มของผักและผลไม้ เมื่อโครงสร้างเซลล์แข็งแรงทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านอื่นๆ ตามมา เช่น ลดการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ ยับยั้งกระบวนการเกิดสีน้ำตาลเป็นต้น (Alandes *et al.*, 2009) มีการศึกษาผลของการใช้แคลเซียมแลคเตทในการล้างผักกาดแก้ว (Iceberg lettuce) พร้อมบริโภค พบว่าการใช้แคลเซียมแลคเตทความเข้มข้น 1.5% สามารถยับยั้งกระบวนการเกิดสีน้ำตาล และกิจกรรมของเอนไซม์ PPO นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มความแน่นเนื้อ ในขณะที่แคลเซียมแลคเตทความเข้มข้น 3.0% สามารถยับยั้งกระบวนการหายใจได้ (Martin-Diana *et al.*, 2005) นอกจากนี้มีรายงานการใช้แคลเซียมแลคเตทที่ความเข้มข้น 15 กรัม/ลิตร ร่วมกับการใช้ไอโซน 1 มิลลิกรัม/ลิตร ในผักกาดตัดแต่งพร้อมบริโภค พบว่าสามารถลดการเกิดสีน้ำตาลได้ โดยไปมีผลในการยับยั้งกิจกรรมของ Polyphenol oxidase (PPO) ที่เป็นสาเหตุของกระบวนการ

เกิดสีน้ำตาล ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันกับการลดลงของกิจกรรม PME (Rico *et al.*, 2007) จากการศึกษาพบว่าแคลเซียมมีผลต่อการเพิ่มความแข็งแรงของเซลล์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาความแข็งแรงของเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Malondialdehyde (MDA), Hydrogen peroxide และกิจกรรมของเอนไซม์ Lipoxigenase (LOX) ที่เพิ่มสูงขึ้น โดย เอนไซม์ LOX ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Lipid peroxidation) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดปริมาณของ Hydrogen peroxide และ MDA เพิ่มขึ้นภายในเซลล์ (Babenko *et al.*, 2017)

ดังนั้น การศึกษาผลของแคลเซียมแลคเตทจึงมีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาและวิจัย เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการยืดอายุการเก็บรักษา และคุณภาพของผลิตภัณฑ์หลังการเก็บเกี่ยว โดยมีสมมุติฐานที่ว่าสารแคลเซียมแลคเตทเกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของโครงสร้างเซลล์ และส่งผลต่อการยับยั้งกระบวนการเกิดสีน้ำตาลและการเสื่อมสภาพของผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมผลิตผล

นำผักกาดหวาน (Romaine lettuce) ที่เก็บเกี่ยวในระยะความแก่ทางการค้า ปราศจากโรคและตำหนิ มีขนาดใกล้เคียงและสม่ำเสมอ นำมาหั่นให้เป็นสี่เหลี่ยมขนาด 4×3 เซนติเมตร จากนั้นนำไปล้างในสารละลาย Sodium hypochlorite (Chlorox®) ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm นาน 5 นาที ทำการล้างด้วยน้ำเปล่า เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างสารละลาย Sodium hypochlorite ที่ตกค้างออก นำตัวอย่างผักกาดหวานที่ได้ไปแช่ในน้ำกลั่น (Control) และสารละลาย 1.5% แคลเซียมแลคเตทเป็นเวลา 10 นาที ทำการสลัดน้ำออกให้แห้ง จากนั้นบรรจุลงในกล่องพลาสติก Polypropylene (ขนาด 12×15×6 เซนติเมตร) น้ำหนัก 55-60 กรัม จำนวน 48 กล่อง

โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มการทดลองกลุ่มละ 24 กลุ่ม นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 6 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 85% วิเคราะห์ค่าการเกิดสีน้ำตาล (Browning index), สารประกอบฟีนอล, กิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase (PAL), Polyphenol oxidase (PPO) และ Peroxidase (POD) ในระหว่างเก็บรักษาเป็นเวลา 0, 2, 5, 10 และ 15 วัน ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีจะถูกทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

1. ค่า Browning index (BI) และการเปลี่ยนแปลงสีบริเวณเส้นกลางใบ (ดัดแปลงจาก Pen and Jiang, 2003)

การวัดค่า BI และสีที่บริเวณรอยตัดมีการนำตัวอย่างมาหั่น 10 ชิ้น จำนวน 3 ซ้ำ ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 30 ชิ้น การวัดค่า BI เป็นการให้คะแนนการเกิดสีน้ำตาลในแต่ละชิ้น เกณฑ์การให้คะแนนการเกิดสีน้ำตาลแบ่งเป็น 5 คะแนน ได้แก่ 5 = เกิดสีน้ำตาลรุนแรงมาก, 4 = เกิดสีน้ำตาลรุนแรง, 3 = เกิดสีน้ำตาลปานกลาง, 2 = เกิดสีน้ำตาลน้อย, 1 = เกิดสีน้ำตาลน้อยมาก และ 0 = ไม่เกิดสีน้ำตาล และการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีบริเวณเส้นกลางใบ ใช้เครื่อง Chroma meter (HunterLab, MiniScan EZ)

2. ปริมาณสารประกอบ Phenolic compounds (Ketsa and Atantee, 1998)

ตัวอย่างบดละเอียด 0.50 กรัม เติมน้ำตาลละลาย 80% Ethanol ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำของเหลวที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ความคมอุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส ผิดสารละลายส่วนใสที่ได้มา 60 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำตาลละลาย 10% Folin-ciocalteu reagent ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 8 นาที เติมน้ำตาลละลาย ความเข้มข้น Sodium carbonate 7.5% จำนวน 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้นำไป

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน Gallic acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)

3. กิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase (PAL) (ดัดแปลงจาก Ke and Saltveit, 1989)

ตัวอย่างบดละเอียด 0.50 กรัม เติมน้ำตาลละลาย 0.05M Sodium borate buffer pH 8.8 ที่เย็นลงไป 1 มิลลิลิตร นำไป Homogenizer ที่ 15,000 รอบนาที เป็นเวลา 30 นาที ความคมอุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาอัตราปฏิกิริยาต่อไปทันที โดยแบ่งออกเป็น 2 หลอดทดลอง หลอดที่ 1 (Blank) เติมน้ำตาลละลาย 0.05M Sodium borate buffer pH 8.8 จำนวน 1.5 มิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร หลอดที่ 2 เติมน้ำตาลละลาย 0.05M Sodium borate buffer pH 8.8 จำนวน 1.5 มิลลิลิตร สารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร และฟีนอลอะลานีน (10 มิลลิกรัม: น้ำ 1 มิลลิลิตร) จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าส่วนผสมในแต่ละหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า แล้วนำไปบ่มในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5N ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลอด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ผลหรือค่าดูดกลืนแสงที่ได้ แสดงออกมาในรูปอัตราปฏิกิริยาเอนไซม์ PAL เมื่อเปรียบเทียบกับ Blank โดย 1 หน่วยปฏิกิริยา คือ ปริมาณของเอนไซม์ PAL ที่ทำให้เกิด Cinnamic acid 1 โมล ในเวลา 1 ชั่วโมง

4. กิจกรรมของเอนไซม์ Polyphenol oxidase (PPO activity) และ Peroxidase (POD activity)

ซึ่งตัวอย่างบดละเอียด 0.50 กรัม เติมน้ำตาลละลาย 0.5M potassium phosphate buffer 6.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายส่วนใสเข้าเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ความคมอุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส

ที่ 4 องศาเซลเซียส นำสารสกัดละลายเอนไซม์ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976)

กิจกรรมของเอนไซม์ PPO ประกอบด้วยสารละลาย 0.5M Sodium phosphate buffer 6.5 และ 0.25M Catachol ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 480 นาโนเมตร โดยวัดทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที กำหนดให้ 1 unit ของ PPO หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ซึ่งทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วยในเวลา 1 นาที (Galeazzi and Sgarbieri, 1981)

กิจกรรมของเอนไซม์ POD ประกอบด้วย 0.2M Sodium phosphate buffer 6.5, 16mM Guaiacol, 2mM Hydrogen peroxide ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 470 นาโนเมตร เป็นเวลา 3 นาที กำหนดให้ค่า Extinction coefficient 26.6 mM⁻¹.cm⁻¹ (Castillo *et al.*, 1984)

5. Lipoxigenase (LOX activity) (Maalekuu *et al.*, 2006)

ซึ่งตัวอย่างบดละเอียด 0.50 กรัม เติมสารละลาย 0.5M Sodium phosphate buffer 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายส่วนใส่เข้าเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารสกัดละลายเอนไซม์ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีน โดยกิจกรรมของเอนไซม์ LOX ประกอบด้วยสารละลาย 7mM linoleic acid และ 0.2M Sodium phosphate buffer 6.5 ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 นาโนเมตร เป็นเวลา 2 นาที กำหนดให้ค่า Extinction coefficient 25.0mM⁻¹.cm⁻¹

6. การวิเคราะห์ Malondialdehyde (MDA) (Hodges *et al.*, 1999)

ซึ่งตัวอย่างบดละเอียด 0.50 กรัม เติม 80% Ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย

ส่วนใส่เข้าเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำตัวอย่างมา 200 ไมโครลิตร เติม 0.65% Thiobarbituric acid (TBA) ที่ประกอบไปด้วย 20% Trichloroacetic acid (TCA) และ 0.01% Butylated hydrotolene (BHT) นำตัวอย่างผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทั้งสารละลายให้เย็นในถ้ำน้ำแข็ง จากนั้นนำไปทำการเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440, 532 และ 600 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณ

$$A = (Abs\ 532_{+TBA}) - (Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})$$

$$B = (Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) \times 0.0571$$

$$MDA\ (nmol\ mL^{-1}) = (A - B / 157000) / 10^6$$

$$-TBA = 20\% TCA + 0.01\% BHT$$

$$+TBA = \text{มีการเติมสารละลาย TBA}$$

7. การวิเคราะห์หา Hydrogen peroxide (Velikova *et al.*, 2000)

ซึ่งตัวอย่างบดละเอียด 0.5000 กรัม เติมสารละลาย 1.0% Trichloroacetic acid (1.0% TCA) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณอนุมูลอิสระในรูป Hydrogen peroxide โดยนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 0.5M Sodium phosphate buffer 7.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย 1M Potassium iodide ปริมาตร 40 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 390 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน Hydrogen peroxide (ไมโครโมล

8. การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's Honesty Significant Difference (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p \leq 0.01$) โดยใช้ R Program version 2.15.1

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การเกิดสีน้ำตาลเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วที่บริเวณรอยตัด และบาดแผล การเกิดสีน้ำตาลเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ถูกทำลาย เช่น จากการตัด หั่น ทำให้เกิดการออกซิเดชันของสารประกอบไดฟีนอลิก (Diphenolic compound) โดยมีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ในสภาวะที่มีอากาศ เกิดเป็นสาร o-diphenol จากนั้น o-diphenol จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นสารควิโนน (o-quinone) แล้วจึงเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (Polymerization) ของสารควิโนนกับกรดอะมิโนหรือโปรตีนต่อไปได้เป็นสารสีน้ำตาลที่ไม่ละลายน้ำ ที่เรียกว่า Melanin (Martinez and Whitaker, 1995) การเกิดสีน้ำตาลของผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคสามารถวิเคราะห์ได้จากคะแนนการเกิดสีน้ำตาล (Browning index, BI) (Figure 1) และการเปลี่ยนแปลงสีบริเวณรอยตัด

ได้แก่ Hue, Chroma และ ΔE (Figure 2) โดยค่า Chroma คือ ค่าความเข้มของสี, Hue คือ ค่าเฉดสี และค่า ΔE คือ ค่าความแตกต่างของสี จากผลการทดลองพบว่าค่า BI ในผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่แช่และไม่ได้แช่สารละลายแคลเซียมแลคเตทมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา โดยค่า BI มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 5 ของการเก็บรักษาจนกระทั่งวันสุดท้ายของการเก็บรักษา การใช้แคลเซียมแลคเตทที่ระดับความเข้มข้น 1.5% สามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงการเกิดสีน้ำตาลได้ เมื่อตรวจสอบการเกิดสีน้ำตาลบริเวณรอยตัด พบว่ามีความสัมพันธ์กับค่าการเกิดสีน้ำตาล ผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่แช่แคลเซียมแลคเตท มีค่า Chroma สูง และ Hue และ ΔE ต่ำกว่าไม่ได้แช่แคลเซียมแลคเตท โดยค่า Hue ที่ 0 องศา แสดงค่าสีแดง และค่า Hue 90 องศา แสดงค่าสีเหลือง นั้นแสดงให้เห็นว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่แช่แคลเซียมแลคเตทมีค่าออกสีแดงหรือสีน้ำตาลน้อยกว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่ไม่ได้แช่แคลเซียมแลคเตท สอดคล้องกับการทดลองของ Martin-Diana *et al.* (2005) ที่มีการศึกษาผลของการใช้ 1.5% แคลเซียมแลคเตทในการล้าง Iceberg lettuce พร้อมบริโภค พบว่าการใช้แคลเซียมแลคเตทสามารถยับยั้งกระบวนการเกิดสีน้ำตาลได้

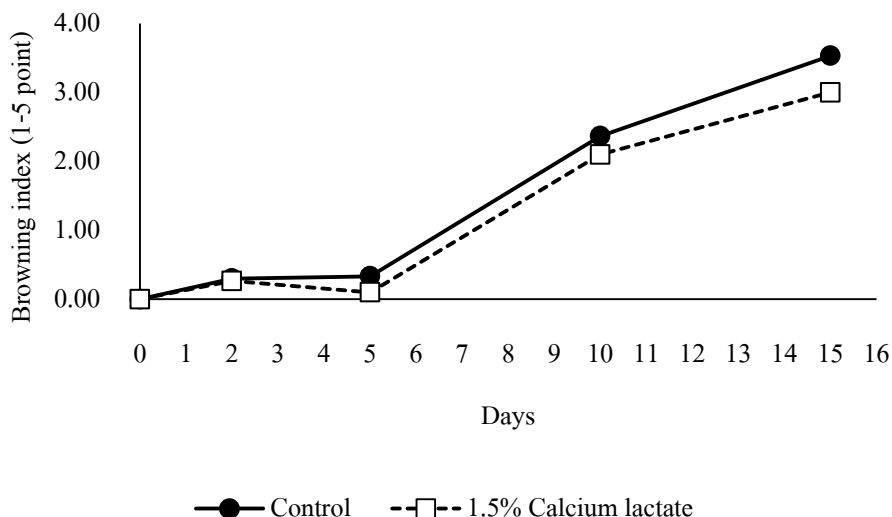


Figure 1 The Browning index (BI) in fresh-cut romaine lettuce was not treated with calcium lactate (control) and treated with 1.5% calcium lactate stored at 6 ± 1 °C, RH 85%. Error bars represent $\pm$ standard error (SE) (n=30).

ปริมาณสารประกอบฟีนอลเป็นตัวบ่งบอกถึงกระบวนการเกิดสีน้ำตาลในผักและผลไม้ เมื่อเซลล์ของผลผลิตถูกทำลาย สารต่างๆ ภายในเซลล์เกิดการรั่วไหลออกมาทำให้สารประกอบฟีนอลสัมผัสกับอากาศ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการเกิดสีน้ำตาลอันเนื่องมาจากเอนไซม์ (Enzymatic browning) โดยมี Polyphenol oxidase (PPO) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดกระบวนการ Polymerization เกิดเป็นสารประกอบสีน้ำตาล ดังนั้นการสะสมหรือการเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลในเซลล์มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของการเกิดสีน้ำตาลจากการทดลองพบว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อม

บริโภคที่ไม่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตทมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงกว่าการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตท (Figure 3) การใช้สารละลายแคลเซียมแลคเตทส่งผลให้ปริมาณของสารประกอบฟีนอลต่ำกว่าไม่ใช้เนื่องจากแคลเซียมมีผลต่อการเพิ่มความแข็งแรงของเนื้อเยื่อภายในเซลล์ ดังนั้นเมื่อเซลล์เกิดความแข็งแรงเอนไซม์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลภายในเซลล์จึงลดลง นอกจากนี้ พบว่าการลดลงของสารประกอบฟีนอลสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่ลดลง ซึ่งเอนไซม์ PAL มีหน้าที่กระตุ้นการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลในพืช

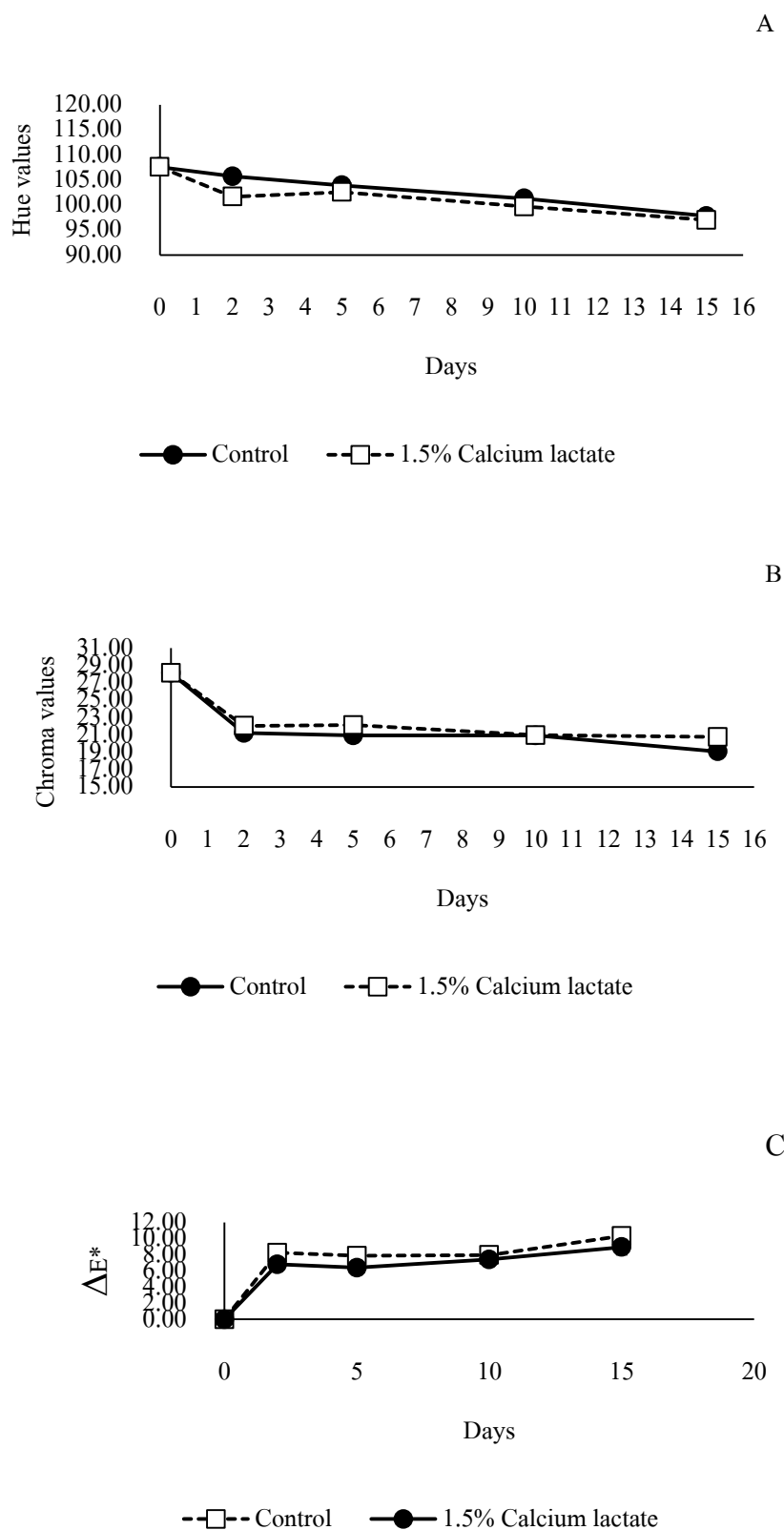


Figure 2 Change of midrib color in fresh-cut romaine lettuce was not treated with calcium lactate (control) and treated with 1.5% calcium lactate stored at 6 ± 1 °C, RH 85%. A: Hue values, B: Chroma value and C: ΔE . Error bars represent $\pm$ standard error (SE) (n=30).

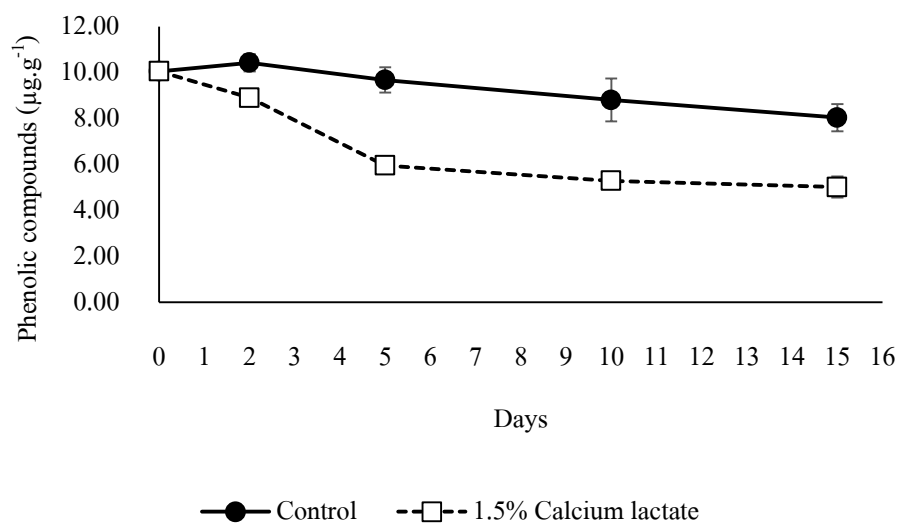


Figure 3 Change of phenolic compounds in fresh-cut romaine lettuce was not treated with calcium lactate (control) and treated with 1.5% calcium lactate stored at 6 ± 1 °C, RH 85%. Error bars represent $\pm$ standard error (SE) (n=3).

นอกจากนี้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonialyase (PAL) Polyphenol oxidase (PPO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล (Figure 4 และ Figure 5) จากการทดลอง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ PAL และ PPO ในผักกาดหวานที่มีการแช่สารละลายแคลเซียม แลคเตตต่ำกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าผักกาดหวานที่ไม่มีการแช่สารละลาย โดยทั่วไปเนื้อเยื่อพืชมีการสร้างกิจกรรมของเอนไซม์ PAL และ PPO เมื่อพืชเกิดความเครียดหรือบาดเจ็บ (Peiser *et al.*, 1998; Chutichudet *et al.*, 2011) โดยมีเอนไซม์ PAL กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอล และมีเอนไซม์ PPO เร่งกระบวนการเกิดสีน้ำตาล จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมแลคเตต

มีผลต่อการลดลงของสารประกอบฟีนอล กิจกรรมของเอนไซม์ PAL และ PPO ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของการเกิดสีน้ำตาลของผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภค มีรายงานว่า การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในผักกาดสามารถยับยั้งความรุนแรงจากการเกิดสีน้ำตาลได้ (Peiser *et al.*, 1998) กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงของเซลล์ สามารถพิจารณาได้จากผักกาดหวานที่มีการแช่สารละลายแลคเตตที่มีปริมาณของ MDA และกิจกรรมของเอนไซม์ LOX ต่ำกว่าที่ไม่ได้แช่สารละลาย โดยปริมาณของ MDA และกิจกรรมของเอนไซม์ LOX ที่สูงบ่งบอกถึงการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อเซลล์ที่มากขึ้น

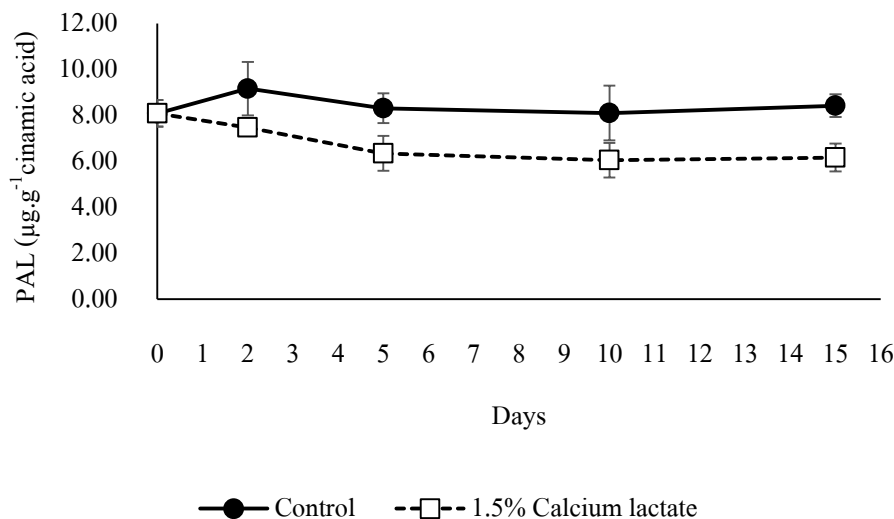


Figure 4 Change of Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in fresh-cut romaine lettuce was not treated with calcium lactate (control) and treated with 1.5% calcium lactate stored at 6 ± 1 °C, RH 85%. Error bars represent $\pm$ standard error (SE)(n=3).

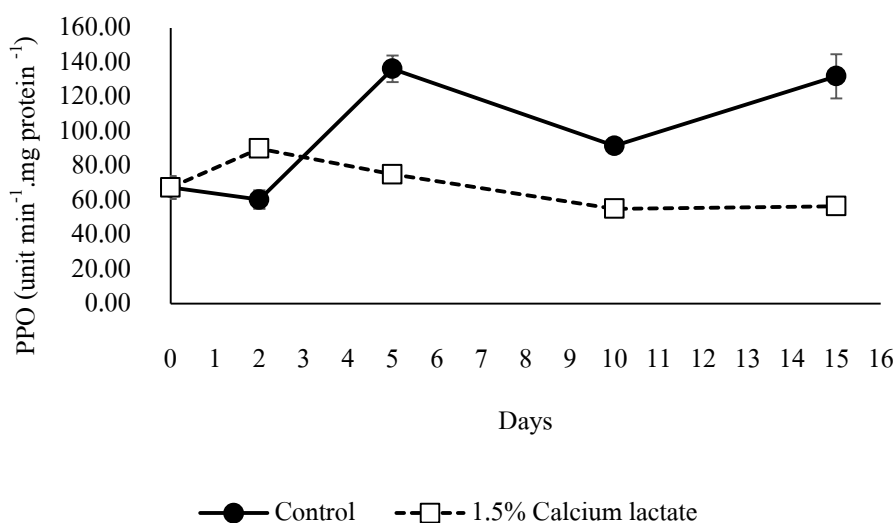


Figure 5 Change of Polyphenol oxidase (PPO) activity in fresh-cut romaine lettuce was not treated with calcium lactate (control) and treated with 1.5% calcium lactate stored at 6 ± 1 °C, RH 85%. Error bars represent $\pm$ standard error (SE) (n=3).

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ POD ในผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่ไม่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตทและแช่สารละลาย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (Figure 6) จากการทดลอง พบว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อม

บริโภคที่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตทมีกิจกรรมของเอนไซม์ POD น้อยกว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่ไม่มีการแช่สาร กิจกรรมของเอนไซม์ POD มีความสัมพันธ์กับการเกิดสีน้ำตาลในพืชบางชนิดและมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง

ความเครียดในพืช (Razzoli *et al.*, 2015) การที่กิจกรรมของ POD ต่ำอาจแสดงให้เห็นว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตทมีความเครียดน้อยในระหว่างการเก็บรักษา แคลเซียมแลคเตทสามารถเพิ่มความแน่นเนื้อให้กับพืชได้ โดยแคลเซียมสามารถจับกับเพกทิน (Pectin) ภายในเซลล์ทำให้เซลล์เกิดความ

แข็งแรงเพิ่มขึ้น และส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ POD ลดลง เนื่องจากเอนไซม์ POD จะถูกกระตุ้นเมื่อพืชได้รับความเครียดหรือเกิดชราภาพในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของ LOX, ปริมาณ MDA และ Hydrogen peroxide (Figure 7-9) ที่มีค่าต่ำกว่าว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่ไม่มีการแช่สารละลาย

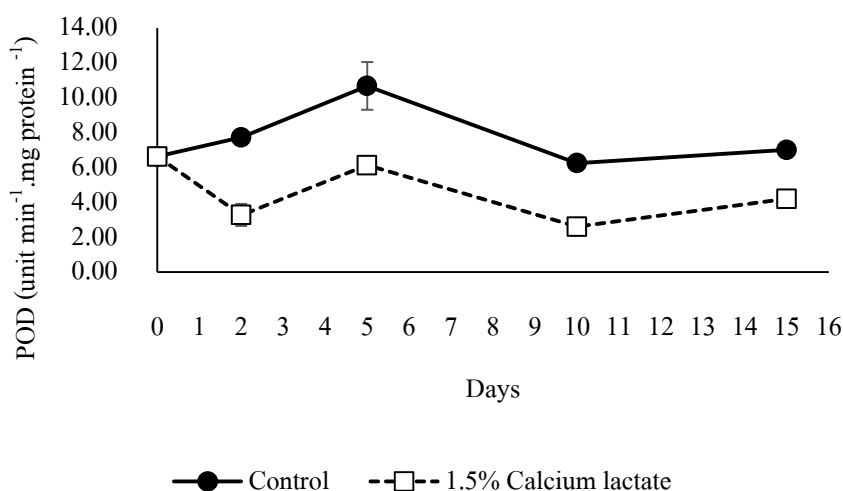


Figure 6 Change of Peroxidase (POD) activity in fresh-cut romaine lettuce was not treated with calcium lactate (control) and treated with 1.5% calcium lactate stored at 6 ± 1 °C, RH 85%. Error bars represent $\pm$ standard error (SE) (n=3).

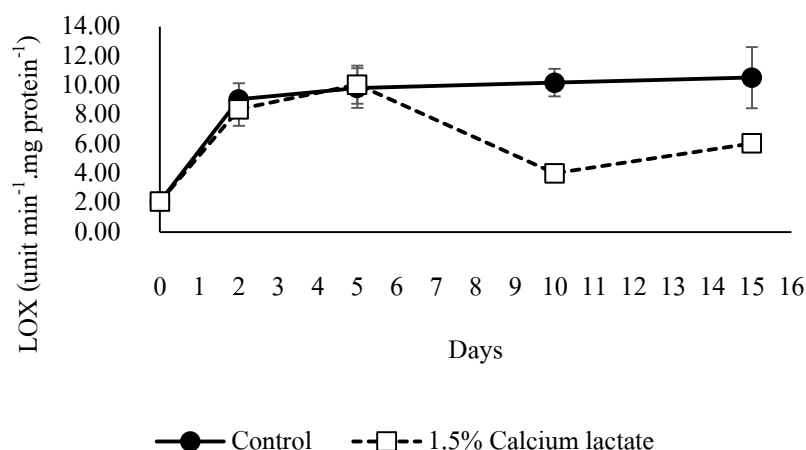


Figure 7 Change of lipoxigenase (LOX) activity in fresh-cut romaine lettuce was not treated with calcium lactate (control) and treated with 1.5% calcium lactate stored at 6 ± 1 °C, RH 85%. Error bars represent $\pm$ standard error (SE) (n=3).

การตรวจสอบการเสื่อมสภาพของเซลล์สามารถวิเคราะห์จากกิจกรรมของเอนไซม์ LOX (Figure 7) เนื่องจาก LOX เป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ส่งผลต่อความเสียหายของเซลล์ (Schmidt and Kunert, 1986) จากการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ LOX มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา และมีค่าคงที่จนกระทั่งวันที่ 5 ของการเก็บรักษา เมื่อมีการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ LOX ในผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตทมีค่าลดลง ในขณะที่ผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่ไม่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตทมีค่าคงที่ แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมแลคเตทมีผลต่อการลดลงการทำงานของเอนไซม์ LOX ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างอนุมูลอิสระ นอกจากนี้มีการศึกษาปริมาณ MDA ในผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภค พบว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่มีการแช่

สารละลายแคลเซียมแลคเตทมีปริมาณ MDA น้อยกว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่ไม่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตท (Figure 8) โดยค่า MDA เป็นค่าที่บ่งบอกถึงกระบวนการเกิด Lipid peroxidation (Shewfelt and Rosario, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ LOX ที่ลดลง จากการทดลองพบว่าการใช้แคลเซียมแลคเตทสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ LOX และลดปริมาณ MDA เนื่องจากแคลเซียมมีบทบาทในการควบคุมโครงสร้างและการทำงานของเซลล์เมมเบรน โดยทำหน้าที่เชื่อมต่อโปรตีนและไขมัน ทำให้เซลล์เกิดความแข็งแรง (Demidchik *et al.*, 2018) หากความแข็งแรงของเซลล์ลดลงทำให้กรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น กรดไขมันเหล่านี้ถูกออกซิไดส์ด้วยเอนไซม์ LOX ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ โดยการเกิดปฏิกิริยาของกรดไขมันแสดงในรูปของปริมาณ MDA ดังนั้น จึงแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมแลคเตทสามารถเพิ่มแข็งแรงให้กับเซลล์เมมเบรน

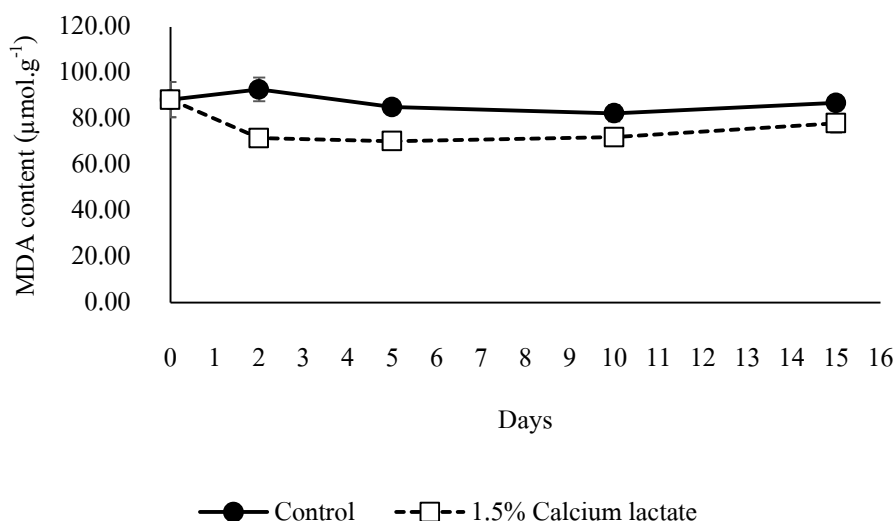


Figure 8 Change of Malondialdehyde content (MDA) in fresh-cut romaine lettuce was not treated with calcium lactate (control) and treated with 1.5% calcium lactate stored at 6 ± 1 °C, RH 85%. Error bars represent $\pm$ standard error (SE) (n=3).

มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Hydrogen peroxide (Figure 9) โดยปริมาณ Hydrogen peroxide ที่สูงขึ้นแสดงถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเยื่อหุ้มเซลล์หรือการเสื่อมสภาพของพืช เนื่องจากในสถานะที่เซลล์เสื่อมสภาพชักนำให้เกิด Reactive oxygen species (ROS) เช่น Singlet oxygen (O_2^1), Hydrogen peroxide (H_2O_2), Superoxide (O_2^-) เป็นต้น (Sharma *et al.*, 2012) จากการเปรียบเทียบปริมาณ Hydrogen peroxide ในผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่ไม่มีการแช่และมีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตทพบว่าผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคที่มีการแช่สารละลายแคลเซียมแลคเตทที่มีปริมาณ Hydrogen peroxide น้อยกว่าที่ไม่ได้แช่สารละลาย (Figure 8)

แสดงให้เห็นว่าสารแคลเซียมแลคเตทสามารถชะลอการเสื่อมสภาพของเซลล์ทำให้เซลล์เกิดความแข็งแรงส่งผลให้การสังเคราะห์ H_2O_2 ลดลง โดยปกติเมื่อพืชเกิดการชราภาพหรือเกิดการตายของเซลล์ (Programmed cell death; PCD) พบว่ามีปริมาณ Hydrogen peroxide เพิ่มขึ้น (Iakimova and Woltering, 2018) ซึ่งเป็นสัญญาณบ่งบอกถึงการชราภาพและการเสื่อมสภาพของเซลล์ ดังนั้น การใช้สารละลายที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบส่งผลให้เซลล์มีความแข็งแรงและชะลอการเสื่อมสภาพของเซลล์ได้ โดยแคลเซียมสามารถรวมตัวกับสารเพกทินภายในเซลล์เกิดเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงที่เรียกว่า Egg-box model

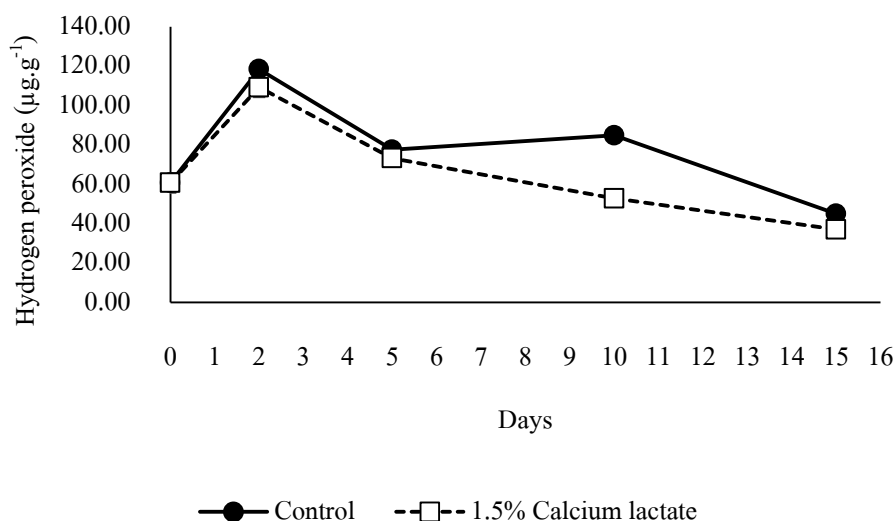


Figure 9 Change of hydrogen peroxide in fresh-cut romaine lettuce was not treated with calcium lactate (control) and treated with 1.5% calcium lactate stored at 6 ± 1 °C, RH 85%. Error bars represent $\pm$ standard error (SE) (n=3).

สรุป

การเกิดสีน้ำตาลในผักกาดหวานแปรรูปพร้อมบริโภคเป็นดัชนีชี้วัดด้านคุณภาพ และการยอมรับของผู้บริโภค จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้แคลเซียมแลคเตทที่ระดับความเข้มข้น 1.5%

สามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงการเกิดสีน้ำตาลได้ การลดลงของการเกิดสีน้ำตาลสัมพันธ์การลดลงของสารประกอบฟีนอล กิจกรรมของเอนไซม์ PAL, PPO และ POD นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายแคลเซียมแลคเตทมีผลในการลดการเสื่อมสภาพของผักกาด

หวานแปรรูปพร้อมบริโภค โดยสอดคล้องกับการลดลงปริมาณ MDA, Hydrogen peroxide และกิจกรรมของเอนไซม์ LOX

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยครั้งนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากสำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

เอกสารอ้างอิง

- Alandes, L., Pérez-Munuera, I., Llorca, E., Quiles, A. and Hernando, I. 2009. Use of calcium lactate to improve structure of “Flor de Invierno” fresh-cut pears. **Postharvest Biology and Technology** 53: 145-151.
- Babenko, L.M., Shcherbatiuk, M.M., Skaterna, T.D. and Kosakivska, I.V. 2017. Lipxygenases and their metabolites in formation of plant stress tolerance. **The Ukrainian Biochemical Journal** 89: 1-211.
- Baysal, T. and Demirdoven, A. 2007. Lipxygenase in fruits and vegetables: A review. **Enzyme and Microbial Technology** 40(4): 491-496.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- Castillo, F.I., Penel, I. and Greppin, H. 1984. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves: involvement of Ca^{2+} . **Plant Physiology** 74: 846-851.
- Chutichudet, B., Chutichudet, P. and Kaewsit, S. 2011. Influence of developmental stage on activities of polyphenol oxidase, internal characteristics and color of lettuce cv. Grand Rapids. **American Journal of Food Technology** 6(3): 215-225.
- Demidchik, V., Shabala, S., Isayenkov, S., Cuin, T.A. and Pottosin, I. 2018. Calcium transport across plant membranes: mechanisms and functions. **New Phytologist** 220: 49-69.
- Galeazzi, M.A.M. and Sgarbieri, V.C. 1981. Substrate specificity and inhibition of polyphenol oxidase (PPO) from a dwarf variety of banana (*Musa cavendishii* L.). **Journal of Food Science** 46: 1404-1406.
- He, Q. and Luo, Y. 2007. Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce. **Stewart Postharvest Review** 3(6): 1-7.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Fomey, C.F. and Prange, R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** 207: 604-611.
- Iakimova, E.T. and Woltering, E.J. 2018. The wound response in fresh-cut lettuce involves programmed cell death events. **Protoplasma** 255: 1225-1238.
- Ke, D. and Saltveit, M.E. 1989. Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. **Physiological Plant** 76: 412-418.

- Ketsa, S. and Atantee, S. 1998. Phenolics, lignin, peroxidase activity and increased firmness of damaged pericarp of mangosteen fruit after impact. **Postharvest Biology and Technology** 14: 117-124.
- Maalekuu, K., Elkind, Y., Leikin-Frenkel, A., Lurie, S. and Fallik, E. 2006. The relationship between water loss, lipid content, membrane integrity and LOX activity in ripe pepper fruit after storage. **Postharvest Biology and Technology** 42: 248-255.
- Martin-Diana, A.B., Rico, D., Frias, J.M., Barat, J.M., Henahan, G.T.M. and Barry-Ryan, C. 2005. Calcium for extending the shelf life of fresh whole and minimally processed fruits and vegetables: a review. **Trends in Food Science and Technology** 18: 210-218.
- Martinez, M.V. and Whitaker, J.R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science and Technology** 6(6): 195-200.
- Moon, K.M., Kwon, E.B., Lee, B. and Kim, C.Y. 2020. Recent trends in controlling the enzymatic browning of fruit and vegetable products. **Molecules** 25: 1-15.
- Peiser, G., López-Gálvez, G., Cantwell, M. and Saltveit, M.E. 1998. Phenylalanine ammonia lyase inhibitors control browning of cut lettuce. **Postharvest Biology and Technology** 14: 171-77.
- Pen, L.T. and Jiang, Y.M. 2003. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. **LWT-Food Science and Technology** 36: 359-364.
- Razzoli, M., Frontini, A., Gurney, A., Mondini, E., Cubuk, C., Katz, L.S., Cero, C., Bolan, P.J., Dopazo, J., Vidal-Puig, A., Cinti, S. and Bartolomucci, A. 2015. Stress-induced activation of brown adipose tissue prevents obesity in conditions of low adaptive thermogenesis. **Molecular Metabolism** 5(1): 1-15.
- Rico, D., Martin-Diana, A.B., Henahan, G.T.M., Frias, J., Barat, J.M. and Barry-Ryan, C. 2007. Improvement in texture using calcium lactate and heat-shock treatments for stored ready-to-eat carrots. **Journal of Food Engineering** 79: 1196-1206.
- Schmidt, A. and Kunert, K.J. 1986. Lipid peroxidation in higher plants: the role of glutathione reductase. **Plant Physiology** 82: 700-702.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany** 217037: 1-26.
- Shewfelt, R.L. and Rosario, B.A.D. 2000. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. **HortScience** 35(4): 575-579.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science** 151:59-66.